

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI  
(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

015116311 \*\*Image available\*\*

WPI Acc No: 2003-176834/ 200318

XRAM Acc No: C03-046677

Mixtures of alpha-hydroxy-omega-alkoxy- and  
alpha-omega-dialkoxy-polyoxyalkylene containing little or no  
dihydroxy-polyoxyalkylene, used for coupling and modification of proteins  
and other bioactive molecules

Patent Assignee: NOVIRA CHEM GMBH (NOVI-N)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 10126158	A1	20021212	DE 1026158	A	20010530	200318 B

Priority Applications (No Type Date): DE 1026158 A 20010530

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
DE 10126158	A1	13	C08L-071/02		

Abstract (Basic): DE 10126158 A1

NOVELTY - Mixtures of at least 70 (preferably at least 90) wt%  
alpha-hydroxy-omega-alkoxy-polyoxyalkylenes (I) and 0.5-30 (preferably  
0.5-10) wt% alpha-omega-dialkoxy-polyoxyalkylenes (II) in which the  
content of dihydroxy-polyoxyalkylenes (III) as impurity is less than 1  
(preferably less than 0.2) wt%.

DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for

(1) mixtures of at least 70 (preferably at least 90) wt%  
alpha-activated-omega-alkoxy-polyoxyalkylenes and 0.5-30 (preferably  
0.5-10) wt% (II) in which the content of di-activated polyoxyalkylenes  
(IV) is less than 1 (preferably less than 0.2) wt%;

(2) mixtures of at least 70 (preferably at least 90) wt%  
alpha-activated-omega-hydroxy-polyoxyalkylenes and 0.5-30 (preferably  
0.5-10) wt% (III) in which the content of (IV) is less than 1  
(preferably less than 0.2) wt%;

(3) a method for the production of the above mixtures by (a)  
converting an initiator of formula R4-(A)-(R10)<sub>j</sub>(XH)<sub>e</sub> into the  
corresponding anion, (b) anionic polymerisation of alkylene oxide(s)  
with the initiator anion as starter molecule to give an alpha-protected  
omega-(poly)hydroxy-polyoxyalkylene, (c) etheration of the  
omega-hydroxy groups with an alkylating agent of formula R5Y and (d)  
cleavage of the protecting group (R4) to liberate the activated or  
activatable groups (A);

(4) mixtures of mono-activated or -activatable polyoxyalkylenes  
with unactivated or unactivatable polyoxyalkylenes obtained by this  
method.

R4=an alkali-stable protecting group;

A=an activated or activatable group;

X=O or NR<sub>3</sub>;

R3=H, aryl or 1-12C alkyl;

e=1-12;

R10=1-12C hydrocarbyl with attached XH residues;

H=acidic hydrogen;

j=0 or 1;

R5=1-12C alkyl; and

Y=halogen or SO<sub>4</sub>R<sub>5</sub>.

USE - Mixtures of mono-activated polyoxyalkylenes as claimed are used for the chemical coupling and modification of proteins and biologically active molecules; mixtures of mono-activatable polyoxyalkylenes are used for the production of mixtures of specific mono-activated polyoxyalkylenes which are used for the above applications (claimed). Modification of proteins etc. with activated polyoxyalkylenes is designed to prevent possible antigenic effects and to increase the half-life of the active agent in the body.

ADVANTAGE - Mixtures of specific alpha-hydroxy-omega-alkoxy-polyoxyalkylenes and omega-dialkoxy-polyoxyalkylenes with little or no dihydroxy-polyoxyalkylene as impurity, and mixtures of corresponding alpha-activated-omega-hydroxy- or alpha-activated-omega-alkoxy-polyoxyalkylenes and alpha-omega-dialkoxy-(or -dihydroxy)-polyoxyalkylenes with minimal amounts of di-activated polyoxyalkylene. The method of production of these mixtures minimises the formation of dihydroxy or di-activated compounds which take part in unwanted crosslinking reactions and would otherwise have to be removed by further difficult and expensive purification.

pp; 13 DwgNo 0/0

Technology Focus:

TECHNOLOGY FOCUS - ORGANIC CHEMISTRY - Preferred Activated Groups: aldehyde or keto groups. Preferred Initiator Molecules: Hydroxy- or amino-(thio)acetals of formula (V) or (VI), and mono-protected di- or poly-hydroxy compounds with alkali-stable protecting groups which are readily cleaved under acid or hydrogenating conditions, especially compounds of formulae R<sub>4</sub>-O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>d</sub>H, R<sub>4</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CR<sub>11</sub>(CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>-O-CH<sub>2</sub>-(CHOH)<sub>a</sub>-CH<sub>2</sub>OH or HOCH<sub>2</sub>-(CHOH)<sub>f</sub>-CH(OR<sub>4</sub>)-(CHOH)<sub>g</sub>-CH<sub>2</sub>OH.

R<sub>8</sub>=1-18C alkyl;

R<sub>6</sub>=H or 1-18C alkyl;

R<sub>7</sub>=1-12C hydrocarbylene (linear or branched) with attached XH residues;

Z=O or S;

R<sub>9</sub>=1-12C alkylene;

R<sub>4</sub>=benzyl, tert.-butyl, triphenylmethyl, methyltriphenylmethyl, diphenylmethyl, trimethoxybenzyl, dimethoxybenzyl, 2-tetrahydropyranyl, methoxymethyl, benzyloxymethyl, tert.-butoxymethyl, 2-methoxyethoxymethyl, 1-ethoxyethyl, 1-methyl-1-methoxyethyl, 1-methyl-1-benzyloxymethyl, p-methoxybenzyl or trialkylsilyl;

R<sub>11</sub>=1-6C alkyl;

d=0-6;

a=0-8;

f=0-4; an

g=0-4.

Preferred Alkylene Oxide: The reactant used in stage (b) (see Independent Claim 3) is ethylene oxide or a mixture of ethylene oxide with 0.1-4 (preferably 0.1-1) wt% glycidol.

POLYMERS - Preferred Mixtures: Mixtures based on polyoxyethylene, with average mol. wts. of 1000-150000, preferably 3000-75000.

Title Terms: MIXTURE; ALPHA; HYDROXY; OMEGA; ALKOXY; ALPHA; OMEGA; POLYOXYALKYLENE; CONTAIN; NO; POLYOXYALKYLENE; COUPLE; MODIFIED; PROTEIN; BIOACTIVE; MOLECULAR

Derwent Class: A96; B04

International Patent Class (Main): C08L-071/02

International Patent Class (Additional): C08G-059/20

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): A12-V01; B04-C03C; B04-N04; B11-C01C

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* H4 H402 H482 H5 H589 H8 M280 M312 M323 M332 M342 M383 M393 M423 M430  
M510 M520 M530 M540 M620 M720 M782 M904 M905 M910 N152 R02044-K  
R02044-M R02044-P

\*02\* M417 M423 M430 M720 M782 M905 N152 RA00I9-K RA00I9-M RA00I9-P

\*03\* M417 M423 M720 M905 N152 RA00H3-K RA00H3-P

Polymer Indexing (PS):

<01>

\*001\* 018; R00351 G1558 D01 D23 D22 D31 D42 D50 D73 D82 F47; P8004 P0975  
P0964 D01 D10 D11 D50 D82 F34; P0055; H0000

\*002\* 018; ND01; Q9999 Q8037 Q7987; B9999 B5094 B4977 B4740; B9999 B4488  
B4466; K9416

Derwent Registry Numbers: 2044-P; 2044-U

Specific Compound Numbers: R02044-K; R02044-M; R02044-P; RA00I9-K; RA00I9-M  
; RA00I9-P; RA00H3-K; RA00H3-P

Key Word Indexing Terms:

\*01\* 900-0-0-0-CL, PRD 184613-0-0-0-CL, PRD 184616-0-0-0-CL, PRD



D3

⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑯ Offenlegungsschrift  
⑯ DE 101 26 158 A 1

⑯ Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 08 L 71/02**  
C 08 G 59/20

⑯ Aktenzeichen: 101 26 158.6  
⑯ Anmeldetag: 30. 5. 2001  
⑯ Offenlegungstag: 12. 12. 2002

⑯ Anmelder:  
Novira Chem GmbH, 84427 Sankt Wolfgang, DE

⑯ Erfinder:  
Erfinder wird später genannt werden

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑯ Eine Methode zur Synthese von Gemischen einfach aktivierter und nicht aktiver Polyoxalkylene zur Modifizierung von Proteinen
- ⑯ Die Erfindung betrifft eine Methode zur Herstellung von hochreinen, spezifisch einseitig aktivierten/funktionalisierten Polyoxalkylenen, die vorwiegend zur Kopplung an Proteine und anderen biologisch aktiven Moleküle eingesetzt werden. Die Methode ist geeignet, Gemische von einfach aktivierten Polyoxalkylenen mit nicht reaktiven Polyoxalkylenen zur Verfügung zu stellen, die eine Vernetzung der Proteine durch mehrfach aktivierte Polyoxalkylenmoleküle ausschließt und damit vielfältige Komplikationen bei der Modifizierung biologisch aktiver Moleküle und Proteine vermeidet.

DE 101 26 158 A 1

# DE 101 26 158 A 1

## Beschreibung

### Hintergrund der Erfindung

- 5 [0001] Biologisch aktive Moleküle, vor allem Proteine und Enzyme steuern und regulieren vielfältige Lebens- und Stoffwechselvorgänge in lebenden Organismen. Für viele medizinische Indikationen und Anwendungen wurden daher chemisch oder biochemisch hergestellte Proteine entwickelt, die ein außergewöhnliches Wirkungsspektrum entfalten. Als nachteilig bei diesen auf reinen Proteinen basierenden Therapien haben sich mögliche antigenen Wirkungen der verabreichten Proteine erwiesen. Darüber hinaus können diese auf Proteinen basierenden Medikamente im allgemeinen nicht oral sondern nur per Injektion verabreicht werden. Auch werden sie relativ schnell über die Niere ausgeschieden, das heißt sie haben im Organismus nur eine sehr begrenzte Halbwertszeit. Eine Vielzahl von Arbeiten haben sich mit der Kopplung verschiedenster synthetischer wasserlöslicher Polymere an solche biologisch aktiven Moleküle beschäftigt, mit dem Ziel möglichen antigenen Wirkungen zu verhindern, sowie die Halbwertszeit im Organismus zu erhöhen. (Delgado C. Francis, G. E. Fisher, D. Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 1992, 9, 2549-304). Als besonders geeignet haben sich dabei Polyoxyalkylene insbesondere Polyoxyethylene gemäß der Strukturformel 1 erwiesen. (Reza Mehvar, J. Pharmaceut Sci. 3 (1) 125, 2000).

### Strukturformel 1

20 ROCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OH (=RO-POE-OH)

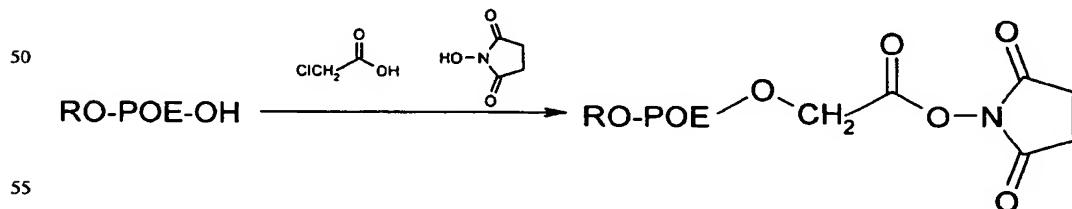
mit R = H: alpha-omega-Dihydroxypolyoxyethylen

mit R = Aryl oder Alkyl alpha-hydroxy-omega-Alkoxy polyoxyethylen bzw. alpha-hydroxy-omega-Aryloxy polyoxyethylen

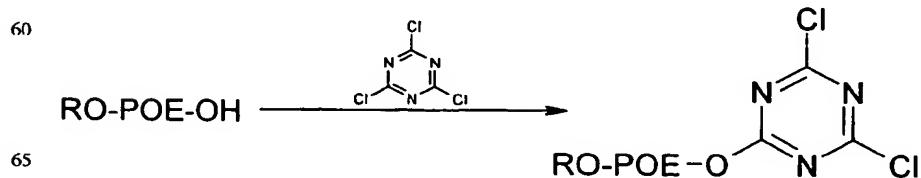
25 und n = 5 bis 2000

[0002] Polyoxyethylene vereinen für diese Anwendung eine Vielzahl von Vorteilen. Sie sind hervorragend wasserlöslich. Sie zeigen praktisch keine antigenen Wirkung. Sie werden enzymatisch nicht abgebaut, sind jedoch bakteriell abbaubar. Sie weisen in wässriger Lösung bedingt durch ihre Koordinationsphäre mit Wassermolekülen ein extrem großes hydrodynamisches Volumen auf. Üblicherweise werden zur Modifizierung von Proteinen die Polyoxyethylene chemisch an freie Amino-, Hydroxy-, Thiol- oder Carboxygruppen des Proteinmoleküls gekoppelt. Die meisten Arbeiten beschäftigen sich mit der Kopplung der Polyoxyethylene an die freien primären Aminogruppen der Proteine, vor allem der Aminosäure Lysin (Veronese, F. M., Caliceti, P., Schiavon, O., Sartore, L. in Poly(ethylene glycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical applications; Plenum Press; New York 1992, Seite 127-136). Ziel ist eine einzelne oder eine definierte Anzahl Polyoxyethylenketten an ein Proteinmolekül zu binden, ohne die biologische Aktivität wesentlich zu verändern, jedoch die Halbwertszeit des Proteins im Körper zu erhöhen und die antigenen Wirkung zu vermindern. Vielfältige Untersuchungen haben gezeigt, dass die gewünschten Wirkungen wie z. B. Erhöhung der Halbwertszeit des Proteins im Körper mit zunehmender Molmasse der Polyoxyalkylene verbessert werden konnten. Für die Kopplung an die Proteine werden Polyoxyalkylene an den freien Hydroxygruppen aktiviert, das heißt die freien Hydroxygruppen chemisch so umgesetzt, dass reaktive Gruppen entstehen, die in einfacher Weise mit den freien Amino-, Hydroxy-, Thiol oder Carboxylgruppen des biologisch aktiven Moleküls reagieren. Es wurde eine Vielzahl von Kopplungsreaktionen entwickelt um Polyoxyethylene/Polyoxyalkylene an biologisch aktive Moleküle chemisch zu binden. (Zalipsky, S., Lee, C. in Poly(ethylene glycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical applications; Plenum Press; New York 1992, Seite 347-370; Kinstler, O. B., Gabriel, N. E., Farrar C. E., DePrince, R. B. US 5,985,265). Beispiele für Reaktionen die zur Aktivierung von Polyoxyethylenen führen sind, einschließlich der resultierenden aktivierten Polyoxyethylenderivate in den folgenden Reaktionsgleichungen 1-4 wiedergegeben.

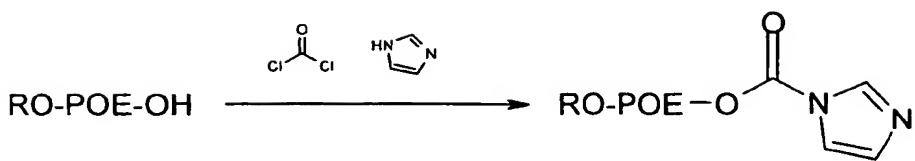
### Reaktionsgleichung 1



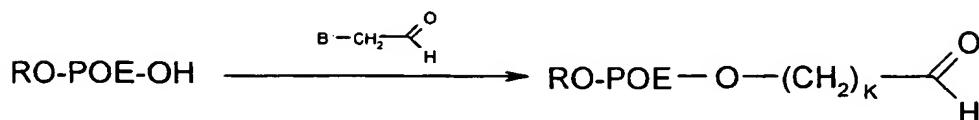
### Reaktionsgleichung 2



## Reaktionsgleichung 3



## Reaktionsgleichung 4



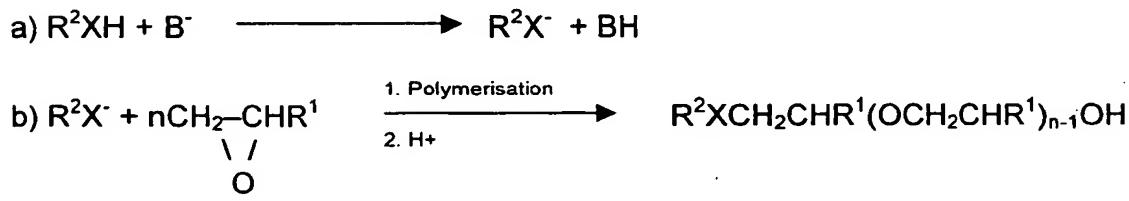
[0003] Im Fall von alpha-omega-Dihydroxypolyoxyethylenen entstehen bei der Aktivierung alpha-omega-diaktivierte Polyoxyethylene.

[0004] Im Fall von alpha-hydroxy-omega-Alkoxypolyoxyethylenen bzw. alpha-hydroxy-omega-Aryloxypolyoxyethylenen entstehen bei der Aktivierung einfach alpha-aktiviertes-omega-Alkoxypolyoxyethylene bzw. einfach alpha-aktiviertes-omega-Aryloxypolyoxyethylene. Für die Kopplung an Proteine und biologisch aktive Moleküle werden im allgemeinen alpha-hydroxy-omega-alkoxy-Polyoxyethylene zu monoaktivierten Polyoxyethylenen umgesetzt, da di-aktiviertes Polyoxyethylene mehrere Proteine vernetzen können. Die Vernetzung von Proteinen durch zweifach aktivierte Polyoxyalkylene hat die auf der nächsten Seite beschriebenen, nachteiligen Effekte wie z. B. erhöhte antigene Aktivität der Proteine oder zusätzliche, aufwendige Reinigung der modifizierten Proteine zur Folge.

[0005] Die Synthese der Polyoxyalkylene selbst erfolgt durch anionische, alkalische Polymerisation von Alkylenoxiden, ausgängend von einem Initiatormolekül, das noch mindestens ein aktives, acides Wasserstoffatom enthält. Das Initiatormolekül wird mit einer Base, im allgemeinen Alkali-, Erdalkalimetallen, Alkalimetallalkoholaten, Alkalimetallhydriden oder Alkalimetallalkylen in ein Initiatoranion (Alkoholat-, Amid- oder im einfachsten Fall ein Hydroxidion) umgesetzt, das die Polymerisation des Alkylenoxid einleitet (Reaktionsgleichung 5a, 5b) (Lit.: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5. Ed. Vol. A21, S. 583). Durch Verwendung von Glycidol als Comonomer können nach dem gleichen Reaktionsschema verzweigte Polyoxyalkylene (Reaktionsgleichung 6a, 6b) hergestellt werden.

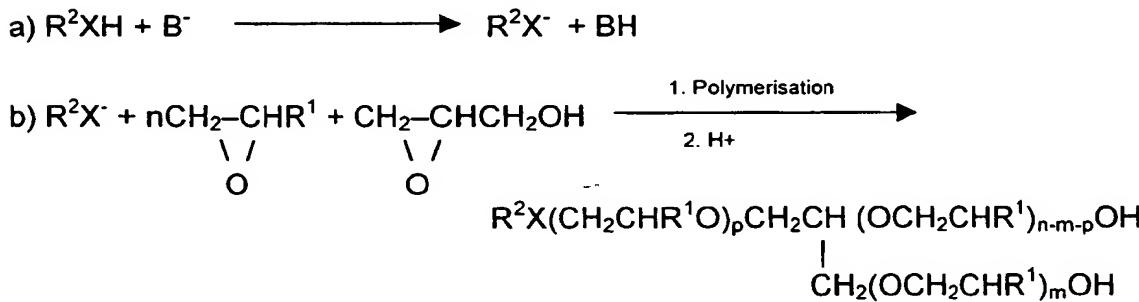
## Reaktionsgleichung 5

## Synthese von linearen Polyoxyalkylenen



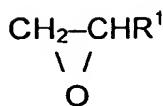
## Reaktionsgleichung 6

## Synthese von verzweigten Polyoxyalkylenen

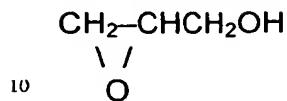


mit  $\text{R}^2 = \text{Alkyl, Aryl, H oder C}_n\text{H}_{2n}\text{XH}$ ,  $\text{X} = \text{O oder NR}^3$  und  $n = 5$  bis  $2000$   $\text{R}^1 = \text{Alkyl oder H}$  und  $\text{R}^3 = \text{Alkyl, Aryl oder H}$ ,  $\text{B} = \text{Base}$  und  $m, p, n$  ganze Zahlen, für die gilt dass  $m + p$  kleiner als  $n$  ist.

65



wird im weiteren als Alkylenoxid bezeichnet



wird im weiteren als Glycidol bezeichnet

$\text{R}^2\text{XH}$  wird im weiteren als Initiatormolekül für die anionische Polymerisation des Alkylenoxids bezeichnet.

$\text{R}^2\text{X}^-$  wird im weiteren als Initiatoranion bezeichnet

15     [0006] Im Falle von  $\text{R}^2 = \text{Alkyl}$  oder  $\text{Aryl}$  und  $\text{X} = \text{O}$  entstehen alpha-hydroxy-omega-Alkoxyalkylene. Im Falle von  $\text{R}^2 = \text{H}$  oder  $\text{R}^2 = \text{Alkenyl-OH}$  entstehen alpha-omega-Dihydroxyalkylene. Bedingt durch die gängige Synthese der alpha-hydroxy-omega-Alkoxyalkylene gemäß Reaktionsgleichung 5a, b enthalten diese wegen der Reaktion des Alkylenoxids mit Spuren von im Alkylenoxid oder Initiatormolekül enthaltenen Wassers und bedingt durch Kettenübertragungsreaktionen immer einen mehr oder weniger großen Anteil an alpha-omega-dihydroxy-Polyoxyethylenen (Leonard, M., Dellacherie, E. Makromol. Chem. 189, 1809-1817 (1988)). Dieser Anteil an alpha-omega-dihydroxy-Polyoxyethylenen nimmt mit zunehmender Molmasse der alpha-hydroxy-omega-Alkoxyalkylene ebenfalls zu. Die alpha-omega-dihydroxy-Polyoxyethylen reagieren bei der Aktivierungsreaktion wie oben beschrieben zu alpha-omega-di-aktivierten Polyoxyethylenen, die bei der Koppelungsreaktion mehrere Proteine vernetzen. Diese vernetzten Proteinspezies zeigen im allgemeinen deutlich verringerte biologische Aktivität und verursachen bei der Applikation antigene Reaktionen im Organismus (Zalipsky, S., Lee, C. in Poly(ethylene glycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical applications; Plenum Press; New York 1992, Seite 347-370; Kinstler, O. B., Gabriel, N. E., Farrar C. E., Deprincc, R. B. US 5.985.265). Aus diesem Grunde erfordert die Gegenwart der alpha-omega-dihydroxy-Polyoxyethylen- bzw. der alpha-omega-di-aktivierten Polyoxyethylen-Verunreinigungen aufwendige und teure Nachreinigungen der Polyoxyethylen-modifizierten Proteine. Zudem geht ein nicht unwe sentlicher Teil des teuren Ausgangsproteins durch die Vernetzungsreaktion verloren.

20     [0007] Im Gegensatz dazu stören alpha-omega-dialkoxy-Polyoxyalkylene die Proteinmodifizierung und Proteinkopplung nicht, da sie in Folge der vollständigen Veretherung der Endgruppen nicht weiter aktiviert werden können und nicht an Proteine koppeln können.

25     [0008] Die vorliegender Erfindung zugrunde liegende Aufgabe bestand somit darin Gemische aus spezifisch alpha-hydroxy-omega-alkoxy-Polyoxyalkylene mit alpha-omega-dialkoxy-Polyoxyalkylenen, die keine oder nur minimale Verunreinigungen an alpha-omega-dihydroxy-Polyoxyalkylenen enthalten sowie eine Methode zu deren Herstellung zu entwickeln. Diese Gemische müssen leicht in spezifisch einfach aktivierte Polyoxyalkylene und alpha-omega-dialkoxy-Polyoxyalkylene überführbar sein und dürfen keine oder nur minimale Anteile mehrfach aktivierte Verunreinigungen enthalten. Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung kann auch durch direkte Herstellung von Gemischen, die aus spezifisch einseitig aktivierten Polyoxyalkylenspezies (alpha-aktivierte-omega-alkoxy-Polyoxyalkylene oder alpha-aktivierte-omega-hydroxy-Polyoxyalkylene) mit nicht aktivierte alpha-omega-dialkoxy- oder nicht aktivierte alpha-omega-dihydroxy-Polyoxyalkylenen bestehen, die keine oder nur minimale Anteile alpha-omega-mehrfa ch aktivierte Polyoxyalkylen-Verunreinigungen enthalten, erreicht werden.

30     [0009] Überraschenderweise konnte diese Aufgabe wie im weiteren beschrieben durch einen aus vier Schritten zusammen gesetzten Prozess gelöst werden, ausgehend von einem Initiatormolekül für die anionische, alkalische Polymerisation von Alkylenoxiden, das folgende Voraussetzungen erfüllt:

35     Das Initiatormolekül muss mindestens ein acides Wasserstoffatom an einer Sauerstoff oder Stickstoffgruppe aufweisen und gleichzeitig eine aktivierte oder aktivierbare Gruppe A, die durch eine Schutzgruppe (im weiteren gekennzeichnet durch  $\text{R}^4$ ), die unter alkalischen Bedingungen stabil geschützt ist, enthalten. Das acide Wasserstoffatom (H), wird im 1. Reaktionsschritt mit einer Base wie zum Beispiel Alkali- oder Erdalkalimetallen, Alkalimetallalkoholaten, Alkalimetallhydriden oder Alkalimetallalkylen zum entsprechende Initiatoranion umgesetzt, das die anionischen Polymerisation von Alkylenoxid einleitet. Die Schutzgruppe  $\text{R}^4$  schützt die aktivierte oder aktivierbare Gruppe A unter den Bedingungen der Alkylenoxidpolymerisation. Die Schutzgruppe  $\text{R}^4$  des Initiatormoleküls muss nach der Polymerisation leicht entfernbare sein. Die geschützte aktivierte oder aktivierbare Gruppe stellt eine Gruppe dar, die nach der Abspaltung der Schutzgruppe direkt mit einem Protein regieren kann oder durch chemische Umsetzung wie z. B. Veresterung, Amidierung leicht in eine aktivierte Gruppe umgewandelt werden kann.

40     [0010] In einem bevorzugten Fall der Erfindung ist die aktivierbare Gruppe eine Hydroxygruppe. Das Initiatormolekül wird durch die allgemeine Formel  $\text{R}^4-(\text{A})-(\text{R}^{10})_j(\text{XII})_e$  (mit  $e = 1$  bis 12,  $\text{R}^4$  die oben beschriebene Schutzgruppe, A die geschützte aktivierbare oder aktivierte Gruppe, XH die OH oder  $\text{NHR}_3$ -Gruppe,  $\text{R}^{10}$  eine beliebige lineare oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 12 C-Atomen an denen XH-Reste gebunden sind,  $j = 0$  oder 1) wiedergegeben. Im Falle von Verbindungen mit zwei und mehreren XH-Endgruppen (e größer oder gleich 2) entstehen verzweigte Polyoxyalkylene. Einen Sonderfall der Erfindung ist gegeben wenn die Sauerstoff- oder Stickstoffgruppe, die das acide H Atom aufweist gleichzeitig die geschützte aktivierbare Gruppe darstellt. In diesem Fall, wie beispielsweise bei t-Butanol, Benzylalkohol, Di- oder Triphenylmethanol ist  $j = 0$  und  $(\text{A}-\text{X}) = \text{Sauerstoff}$ .

45     [0011] Unter einer aktivierte Gruppe werden im weiteren reaktive Endgruppen von Polyoxyalkylen verstanden, die aus der aktivierbaren Gruppe hergestellt werden können und die befähigt sind das Polyoxyalkylen chemisch an eine reaktive Amino-, Thiol-, Hydroxy- oder Carboxylatgruppe eines Proteins oder Biomoleküls zu koppeln. Insbesondere werden folgende Gruppen unter einer aktivierte Gruppe verstanden: Eine Aldehyd-, Keto- oder Carboxylendgruppe, eine

# DE 101 26 158 A 1

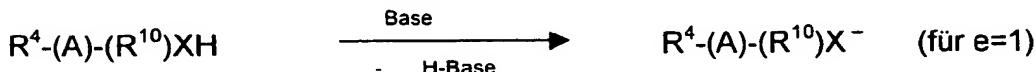
prim. Aminoendgruppe, eine Succinimidylcarbonat-, Nitrophenylcarbonat-, Imidazolylcarbonat- und andere Carbonatesterendgruppen, eine Succinimidylsuccinatendgruppe, eine Succinimidylcarbonylendgruppe, eine Tosylat- oder Tresylatendgruppe, eine Glyoxalendgruppe, eine Imidoesterendgruppe, eine Dichlor-triazinendgruppe, eine Isocyanatgruppe, eine Maleinimidgruppe, eine 2,2,2-Trifluorethansulfonsäuregruppe. Einen erfindungsgemäß bevorzugten Sonderfall stellen Aldehyd- und Ketogruppen dar, da sie geschützt als Acetal eine geschützte aktivierte Endgruppe darstellen.

[0012] Der zusammengesetzte Prozess ausgehend von dem erfindungsgemäßen Initiatormolekül besteht aus den folgenden 4 Schritten (Die Reaktionsgleichungen werden am Beispiel eines Initiatormoleküls mit einer XH-Gruppe dargestellt ( $e = 1$ ), bei mehreren freien XH-Gruppen, entsteht in Reaktionsschritt 1 analog ein Initiatorpolyanion, das in Schritt 2 zu einem verzweigten einfach alpha-geschützten-omega-polyhydroxy-Polyoxyalkylen mit e Hydroxyendgruppen reagiert. In Schritt 3 wird dieses zu einem verzweigten einfach alpha-geschützten-omega-polyalkoxy-Polyoxyalkylen umgesetzt aus dem in Schritt 4 schließlich ein in alpha-Stellung einfach aktivierbares oder einfach aktiviertes poly-omega-alkoxy-Polyoxyalkylen resultiert.)

## 1. Schritt

Überführung des beschriebenen Initiatormoleküls in das entsprechende Initiatoranion

Reaktionsgleichung 7



bzw.



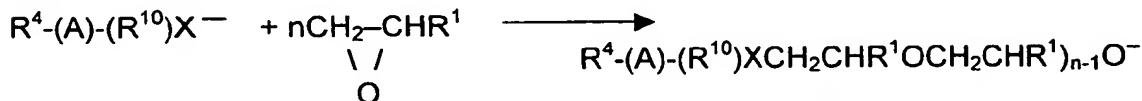
mit  $H = \text{acides Wasserstoffatom}$ ,  $R^4 = \text{Schutzgruppe}$ , die unter alkalischen Bedingungen stabil ist,  $A = \text{aktivierbare Gruppe}$ ,  $X = O$  oder  $NR^3$  und  $R^3 = H$ , Aryl oder  $C_1$  bis  $C_{12}$ -Alkyl und  $a = 1$  bis  $7$  und  $R^{10}$  eine beliebige lineare oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit  $1$  bis  $12$  C-Atomen an denen XH-Reste gebunden sind und  $e = 1$  bis  $12$ ,  $j = 0$  oder  $1$ .

## 2. Schritt

[0013] Anionische Polymerisation des Alkylenoxids an der Alkoholat- bzw. Amid-Gruppe des Initiatormoleküls zu einem alpha-geschützten-omega-hydroxy-Polyoxyalkylen (Reaktionsgleichung 8). Durch Copolymerisation eines Alkylenoxids mit Glycidol (3-Hydroxypropenoxid) (Reaktionsgleichung 9) können an dieser Stelle auch zusätzlich Verzweigungen geschaffen werden und damit auch hier alpha-geschützte-polyomega-hydroxy-Polyoxyalkylene hergestellt werden, die aufgrund der Verzweigung weit größere Molmassen wie lineare alpha-geschützte-omega-hydroxy-Polyoxyalkylene aufweisen können.

Reaktionsgleichung 8

für  $e = 1$



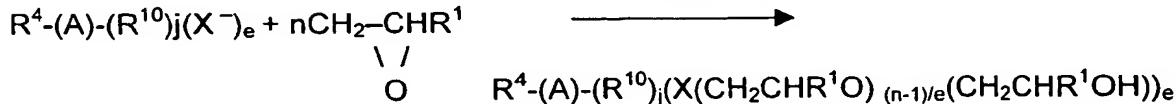
bzw. nach Neutralisation ( $+H^+$ ):



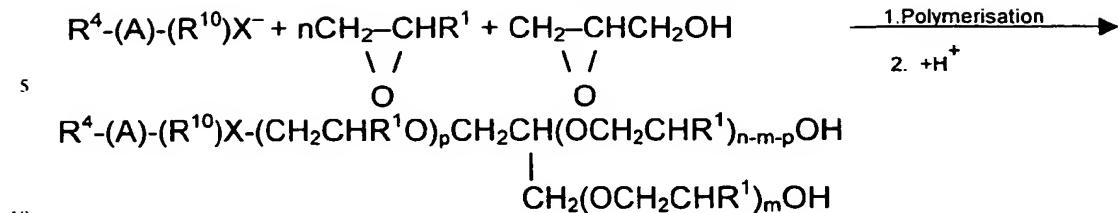
bzw. für  $e > 1$

1. Polymerisation

2. Neutralisation ( $+H^+$ )



## Reaktionsgleichung 9



[0014] Mit den oben genannten Bedeutungen von n, A, R<sup>4</sup>, R<sup>1</sup>, R<sup>10</sup>, X und m, p ganze Zahlen zwischen 0 und 2000 wobei gilt m + p < n.

## 3. Schritt

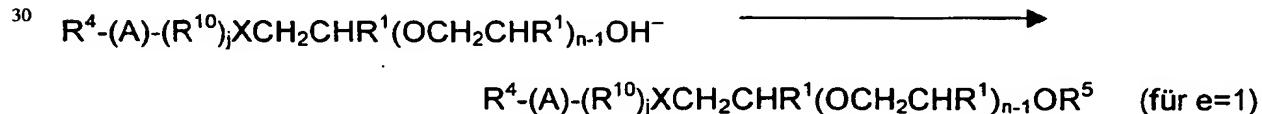
15 [0015] Veretherung der im Schritt 2 gemäß Reaktionsgleichung 8 entstandenen freien -CH<sub>2</sub>CHR<sup>1</sup>OH-omega-Endgruppe bzw. der entsprechenden freien omega-Alkoholatfunktion des alpha-geschützten-omega-hydroxy-Polyoxyalkylen bzw. der gemäß Reaktionsgleichung 9 entstanden freien omega-hydroxy-Endgruppen mit einem Alkylierungsreagens R<sup>5</sup>Y wie beispielsweise einem Alkylhalogenid oder einem Dialkylsulfat. Dabei entstehen gemäß Reaktionsgleichung 10 aus den alpha-geschützten-omega-hydroxy-Polyoxyalkylenen alpha-geschützte-omega-alkoxy-Polyoxyalkylene. Aus den alpha-geschützten-omega-poly-hydroxy-Polyoxyalkylene entstehen dabei alpha-geschützte-omega-poly-alkoxy-Polyoxyalkylene. In jedem Fall werden bei diesem Reaktionsschritt alpha-omega-Dihydroxy-Polyoxyalkylene und alpha-omega-polyhydroxy-Polyoxyalkylene, die im Schritt 2 als unerwünschte Nebenprodukte anfallen zu nicht reaktiven alpha-omega-dialkoxy-Polyoxyalkylenen und alpha-omega-polyalkoxy-Polyoxyalkylene.

20

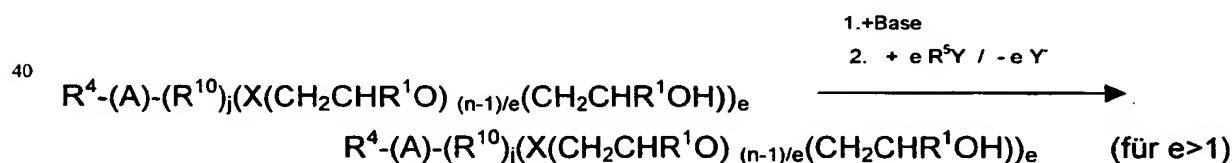
25

## Reaktionsgleichung 10

1. +Base  
2. + R<sup>5</sup>Y / - Y



bzw.



## 4. Schritt

50 [0016] Abspaltung der Schutzgruppe (R<sup>4</sup>) zur direkten Freisetzung der aktivierten Gruppe (A) oder zur Freisetzung der aktivierbaren Gruppe A und nachfolgenden Aktivierung der freigesetzten aktivierbaren Gruppe (A). Entsteht nach der Entfernung der Schutzgruppe direkt ein Gemisch aus alpha-aktivierten-omega-alkoxy-Polyoxyalkylenen und alpha-omega-dialkoxy-Polyoxyalkylenen kann dieses direkt mit Proteinen umgesetzt werden. Ist (A) nur eine aktivierbare Gruppe wie zum Beispiel eine Hydroxygruppe, muß das Gemisch aus alpha-hydroxy-omega-alkoxy-Polyoxyalkylenen und alpha-omega-dialkoxy-Polyoxyalkylenen an der freien Hydroxygruppe weiter zu einer aktiven, zu einer Reaktion mit einem Protein befähigten Gruppe umgesetzt werden.

55

[0017] Einen Sonderfall der Erfindung stellt insbesondere die Abspaltung der Schutzgruppe R<sup>4</sup> aus einem Gemisch von geschützten alpha-aktivierten-omega-hydroxy-Polyoxyalkylenen und alpha-omega-dihydroxy-Polyoxyalkylenen unter Auslassung des Schritts 3 dar. In diesem Fall, der nur möglich ist wenn die Abspaltung direkt zu einem alpha-aktivierten-Polyoxyalkylen führt, kann dieses Gemisch direkt zur Kopplung an Proteine eingesetzt werden ohne Vernetzung der Proteine zu verursachen. Eine weitere Aktivierung dieser spezifischen Gemische aus alpha-aktivierten-omega-hydroxy-Polyoxyalkylenen und alpha-omega-dihydroxy-Polyoxyalkylenen ist nicht möglich, da sie unweigerlich zu zweifach aktivierten Polyoxyalkylenen führen würde.

[0018] Bevorzugt wird für den beschriebenen Prozess die Verwendung von Ethylenoxid zur Herstellung von Gemischen linearer einfacher alpha-aktivierter-omega-alkoxy-Polyoxyethylene bzw. alpha-aktivierbarer-omega-alkoxy-Polyoxyethylene mit nicht reaktiven alpha-omega-dialkoxy-Polyoxyethylenen und die Verwendung eines Monomergemisches von Ethylenoxid mit 0,1–4 Gew.-%, bevorzugt 0,1–1 Gew.-% Glycidol zur Herstellung von Gemischen verzweigter einfacher alpha-aktivierter-polyomega-hydroxy-Polyoxyethylene oder einfacher alpha-aktivierter-poly-omega-alkoxy-Polyoxyethylene mit nicht reaktiven alpha-omega-polyalkyl-Polyoxyethylenen. Erfindungsgemäße Schutzgruppen R<sup>4</sup> sind

# DE 101 26 158 A 1

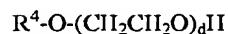
leicht entfernbare Schutzgruppen für Hydroxygruppen, Amino- oder Aldehydgruppen, die unter alkalischen Bedingungen stabil sind. Demgenäß sind bevorzugte Initiatormoleküle einfach geschützte Di- und Polyhydroxyverbindungen (einfach geschützte Glykole, einfach geschütztes Pentaerythrol, Glycerin, Trimethylolpropan oder einfach geschützte Zuckeralkohole) Initiatormoleküle gemäß der vorliegenden Erfindung sind demgemäß Verbindungen der Strukturformel 2, 3, 4 und 5, bei denen die R<sup>4</sup>-Sauerstoffbindung, nach der Umsetzung mit Alkylenoxid in Schritt 2 und der Alkylierung in Schritt 3 unter sauren oder hydrierenden Reaktionsbedingungen in Schritt 4 leicht gespalten werden.

[0019] Erfindungsgemäße Alkohole sind in den Strukturformel 2, 3, 4, 5 und 6 wiedergegeben.

5

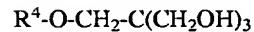
## Strukturformel 2

10



## Strukturformel 3

15



## Strukturformel 4

20



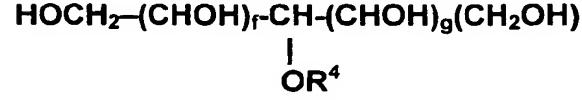
## Strukturformel 5

25



## Strukturformel 6

30



mit R<sup>4</sup> = Benzyl, tert-Butyl, Triphenylmethyl, Methyltriphenylmethyl, Diphenylmethyl Trimethoxybenzyl, Di-methoxybenzyl, 2-Tetrahydropyranyl, 2-Tetrahydrofuranyl, Methoxymethyl, Benzyloxymethyl, t-Butoxymethyl, 2-Methoxyethoxymethyl, 1-Ethoxyethyl, 1-Methyl-1-methoxyethyl, 1-Methyl-1-benzyloxymethyl, p-Methoxybenzyl, Trialkylsilyl und d = 0 bis 6, a = 0 bis 8, f = 0 bis 4, g = 0 bis 4 und R<sup>11</sup> = C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl.

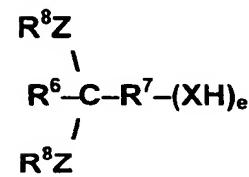
35

[0020] Besonders bevorzugte Initiatormoleküle (R<sup>4</sup>-(A)-(R<sup>10</sup>)(XH)<sub>e</sub>) sind darüber hinaus alpha-hydroxy-omega-Aldehyde bzw. Ketone oder alpha-amino-omega-Aldehyde bzw. Ketone sowie Di- und Polyhydroxyaldehyde und Ketone, deren jeweilige Aldehyd- oder Ketogruppe durch ein Acetal oder ein Thioacetal geschützt sind (R<sup>4</sup> = Acetal- oder Thioacetalgruppe (A) = R<sup>6</sup>-CO-R<sup>7</sup>) (siehe Strukturformel 7, 8).

40

## Strukturformel 7

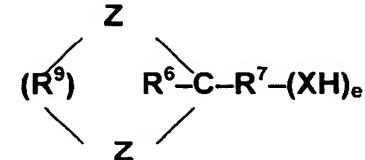
45



50

## Strukturformel 8

55



60

R<sup>8</sup> = C<sub>1</sub> bis C<sub>18</sub>-Alkyl

R<sup>6</sup> = H oder C<sub>1</sub> bis C<sub>18</sub>-Alkyl

R<sup>7</sup> = eine beliebige lineare oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 12 C-Atomen an denen XH-Reste gebunden sind, X = O oder NR<sup>3</sup> mit R<sup>3</sup> = H, Aryl oder C<sub>1</sub> bis C<sub>12</sub>-Alkyl

65

Z = O oder S

R<sup>9</sup> = C<sub>1</sub> bis C<sub>12</sub>-Alkenylrest und e = 1 bis 12.

[0021] Das heißt in der Formel für das erfindungsgemäße Initiatormoleküle (R<sup>4</sup>-(A)-(R<sup>10</sup>)(XH)<sub>e</sub>) ist R<sup>4</sup> gleich zwei R<sup>8</sup>

# DE 101 26 158 A 1

Gruppen bzw. eine  $-(\text{CH}_2)_k$ -Gruppe und die geschützte aktivierte Gruppe (A) ein Aldehyd- bzw. Ketonhydrat  $\text{R}^6-\text{C}(\text{OH})_2-\text{R}^7$ - oder Thioaldehydhydrat  $\text{R}^6-\text{C}(\text{SH})_2-\text{R}^7$ -, die als solche natürlich nicht existieren sondern in die korrespondierenden Aldehyde oder Ketone umlagern und nur in der Form der jeweiligen Acetale bzw. Ketale stabil sind.

[0022] Gegenstand der Erfindung sind auch die gemäß dem oben beschriebenen Verfahren (Schritt 1 bis 4) hergestellten Gemische aus einfach aktivierten Polyoxyalkylenen und nicht aktivierten unreaktiven alpha-omega-dihydroxy-Polyoxyalkylenen beziehungsweise Gemische von alpha-aktivierten-omega-alkoxy-Polyoxyalkylenen und unreaktiven alpha-omega-dialkoxy-Polyoxyalkylenen sowie Gemische aus alpha-hydroxy-omega-alkoxy-Polyoxyalkylenen und alpha-omega-dialkoxy-Polyoxyalkylenen, die einfach in die genannten Gemische, die nur mono-aktivierte Polyoxyalkylene enthalten überführt werden können. Die mittlere molare Massen der erfundungsgemäßen Gemische liegt zwischen 1000 und 150 000 g/mol, bevorzugt zwischen 3000 und 75 000 g/mol.

[0023] Die Gemische enthalten im allgemeinen 70 bis 99,5 Gew.-%, bevorzugt 90 bis 99,5 Gew.-% einfach aktivierte Polyoxyalkylene bzw. einfach aktivierbare alpha-hydroxy-omega-alkoxy-Polyoxyalkylene und 0,5 bis 30 Gew.-%, bevorzugt 0,5 bis 10 Gew.-% unreaktive alpha-omega-dialkoxy-Polyoxyalkylene. Der Anteil an diaktivierten bzw. diaktivierbaren Verunreinigungen ist kleiner 1 Gew.-% bevorzugt kleiner als 0,2 Gew.-%.

[0024] Bevorzugte Gegenstände der Erfindung sind Gemische aus Polyoxyethylenen, die in alpha Stellung als aktivierende Gruppe eine Aldehyd- oder Ketogruppe enthalten und in omega Stellung eine oder mehrere Hydroxygruppen enthalten mit alpha-omega-dihydroxy-Polyoxyethylenen, die gemäß der Abfolge von Schritt 1, 2, 4 aus einem alpha-hydroxy-omega-Aldehyd bzw. Keton oder alpha-amino-omega-Aldehyd bzw. Keton sowie aus Di- und Poly-hydroxy-Aldehyden oder Poly-hydroxy-Ketonen, die an der jeweiligen Aldehyd- oder Ketofunktion mit einer Acetal- oder Thioacetalgruppe geschützt sind, als Initiatormolekül (Strukturformel 7 und 8) und Ethylenoxid oder einem Gemisch aus Glycidol und Ethylenoxid mit einem Anteil von 0,1-4 Gew.-% bevorzugt 0,1-1 Gew.-% Glycidol als Monomere hergestellt werden können. Die Gemische enthalten im allgemeinen 70 bis 99,5 Gew.-%, bevorzugt 90 bis 99,5 Gew.-% monoaldehyd- bzw. -monoketofunktionelle Polyoxyalkylene und 0,5 bis 30 Gew.-%, bevorzugt 0,5 bis 10 Gew.-% unreaktive alpha-omega-dihydroxy-Polyoxyalkylene. Der Anteil an diaktivierten bzw. diaktivierbaren Verunreinigungen ist kleiner 1 Gew.-% bevorzugt kleiner als 0,2 Gew.-%.

[0025] Besonders bevorzugte Gegenstände der Erfindung sind Gemische aus Polyoxyethylenen, die in alpha Stellung als aktivierende Gruppe eine Aldhydgruppe enthalten und in omega-Stellung eine oder mehrere Alkoxygruppe(n) enthalten mit nicht reaktiven alpha-omega-dialkoxy-Polyoxyethylenen bzw. im Falle von Verzweigungen alpha-omega-polyalkoxy-Polyoxyethylenen, die gemäß der Abfolge von Schritt 1, 2, 3, 4 aus einem, an der Aldehydfunktion mit einer Acetal- oder Thioacetalgruppe geschützten alpha-hydroxy-omega-Alkanal oder alpha-amino-omega-Alkanal bzw. Di- und Polyhydroxyaldehyden und Ketonen (Strukturformel 7 und 8) als Initiatormolekül und Ethylenoxid bzw. einem Gemisch aus Glycidol und Ethylenoxid mit einem Anteil von 0,1-4 Gew.-% bevorzugt 0,1-1 Gew.-% Glycidol als Monomer hergestellt werden können. Die Polyoxyalkylengemische enthalten im allgemeinen 70 bis 99,5 Gew.-%, bevorzugt 90 bis 99,5 Gew.-% monoaldehyd- bzw. monoketofunktionelle Polyoxyalkylene und 0,5 bis 30 Gew.-%, bevorzugt 0,5 bis 10 Gew.-% unreaktive alpha-omega-dialkoxy-Polyoxyalkylene. Sie sind dadurch gekennzeichnet, dass sie kleiner 1 Gew.-% bevorzugt kleiner 0,2 Gew.-% alpha-omega-dialkanoxyl- oder alpha-omega-polyalkanoxyl-Polyoxyethylene enthalten.

[0026] Die mittlere molare Massen dieser bevorzugten Gemische liegt zwischen 1000 und 150 000 g/mol, besonders bevorzugt zwischen 3000 und 75 000 g/mol.

[0027] Gegenstand der Erfindung sind weiter Gemische aus alpha-carboxy-omega-alkoxy-Polyoxyethylenen mit nicht reaktiven alpha-omega-dialkoxy- oder alpha-omega-polyalkoxy-Polyoxyethylenen, die gemäß der Abfolge von Schritt 1, 2, 3, 4 aus einem, an der Aldehydfunktion mit einer Acetalgruppe geschützten alpha-hydroxy-omega-Alkanal oder alpha-amino-omega-Alkanal bzw. Di- und Poly-hydroxyalkanal (Strukturformel 7 und 8) als Initiatormolekül und Ethylenoxid bzw. einem Ethylenoxid/Glycidol-Gemisch als Monomer, mit abschließender Oxidation der in Schritt 4 freigesetzten Aldehydgruppe zur Carbonsäure hergestellt werden können. Die Gemische sind dadurch gekennzeichnet, dass sie kleiner 1 Gew.-% bevorzugt kleiner als 0,2 Gew.-% alpha-omega-dicarboxy-Polyoxyethylene enthalten. Die mittlere molare Massen dieser bevorzugten Gemische liegt zwischen 1000 und 150 000 g/mol, besonders bevorzugt zwischen 3000 und 75 000 g/mol. Die Gemische enthalten im allgemeinen 70 bis 99,5 Gew.-%, bevorzugt 90 bis 99,5 Gew.-% monocarboxy-aktivierte Polyoxyalkylene und 0,5 bis 30 Gew.-%, bevorzugt 0,5 bis 10 Gew.-% nicht reaktive alpha-omega-dialkoxy-Polyoxyalkylene.

[0028] Die Gemische können in bekannter Weise z. B. durch Reaktion der Carboxylgruppe mit N-Hydroxy-Succimid in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid weiter zu Gemischen aus alpha-aktivierten-omega-alkoxy-Polyoxyethylenen umgesetzt werden, die kleiner 1 Gew.-% bevorzugt kleiner 0,2 Gew.-% di-aktivierte Polyoxyethylene enthalten.

[0029] Gegenstand der Erfindung sind weiter Gemische aus 70 bis 99,5 Gew.-%, bevorzugt 90 bis 99,5 Gew.-% alpha-hydroxy-omega-alkoxy-Polyoxyethylene mit 0,5 bis 30 Gew.-%, bevorzugt 0,5 bis 10 Gew.-% nicht reaktiven alpha-omega-dialkoxy-Polyoxyethylenen, die gemäß der Abfolge von Schritt 1, 2, 3, 4 aus den einfach geschützten Di- und Polyhydroxyverbindungen (Strukturformel 2, 3, 4, 5) als Initiatormolekül und Ethylenoxid bzw. einem Gemisch von Ethylenoxid mit geringen Mengen Glycidol (0,1 bis 4 Gew.-%, Glycidol bevorzugt 0,1-1 Gew.-%) als Monomer hergestellt werden können. Schritt 4 heinhaltet dabei die Spaltung der ursprünglichen  $\text{R}^4$ -Sauerstoff-Bindung. Die Gemische sind in allen Fällen dadurch gekennzeichnet, dass sie weniger als 1 Gew.-%, bevorzugt weniger als 0,2 Gew.-% alpha-omega-dihydroxy-Polyoxyethylene bzw. alpha-omega-polyhydroxy-Polyoxyethylene enthalten.

[0030] Die mittlere molare Massen dieser bevorzugten Gemische liegt zwischen 1000 und 150 000 g/mol, besonders bevorzugt zwischen 3000 und 75 000 g/mol. Die Gemische können in bekannter Weise zu Gemischen aus alpha-aktivierten-omega-alkoxy-Polyoxyethylenen und alpha-omega-dialkoxy-Polyoxyethylenen bzw. zu Gemischen aus alpha-aktivierten-poly-omega-alkoxy-Polyoxyethylenen und alpha-omega-polyalkoxy-Polyoxyethylenen umgesetzt werden, die die genannten niedrigen Konzentrationen an di-aktivierten oder poly-aktivierte Polyoxyethylenen enthalten. Die vorliegende Erfindung bezieht sich darüber hinaus auf die Verwendung der genannten erfundungsgemäßen Gemische von spe-

# DE 101 26 158 A 1

zifisch einfach alpha-aktivierten-Polyoxyalkylenen mit nicht reaktiven Polyoxyalkylenen, die gemäß Schritt 1 bis 4 und gegebenenfalls nachfolgender Aktivierungsreaktion zugänglich sind, für die Reaktion mit Proteinen und anderen biologisch aktiven Molekülen.

[0031] Insbesondere bezieht sich die vorliegende Erfindung auf die Verwendung der genannten erfindungsgemäßen Gemische aus alpha-alkanolxy-omega-hydroxy-Polyoxyethylenen und alpha-omega-dihydroxy-Polyoxyethylenen sowie auf die Verwendung der alpha-alkanolxy-omega-alkoxy-Polyoxyethylenen und alpha-omega-dialkoxy-Polyoxyethylenen, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die Gemische keine oder nur minimale alpha-omega-dialkanolxy-Polyoxyethylene enthalten, für die Reaktion mit Proteinen und anderen biologischen aktiven Molekülen.

[0032] Die Erfindung wird nun anhand von einigen Beispielen näher verdeutlicht.

## Beispiel 1

Herstellung eines Gemisches aus alpha-(propan-1-al-3-oxy)-omega-butoxy-Polyoxyethylen (molare Masse 4950 g/mol) mit alpha-omega-di-butoxypolyoxyethylen (molare Masse 9500 g/mol)

[0033] Zu einer Lösung von 1,48 g 3,3-Diethoxy-1-propanol in 10 ml THF in einem Druckreaktor bei Raumtemperatur werden unter Stickstoff 2,1 g Diphenylmethylkalium gelöst in 10 ml THF gegeben bis die Färbung verschwindet. Anschließend werden 55 g Ethylenoxid zugegeben und bei Raumtemperatur für 48 Stunden gerührt. Nach der Abreaktion des Ethylenoxids werden 0,2 g NaOH zugegeben und anschließend 1-Chlorbutan im Überschuss zugegeben (4 g) und bei 40°C für 24 Stunden gerührt. Das Reaktionsgemisch wird in Diethylether gegossen und das unlösliche Polymergemisch aus alpha-(1,1-Diethoxy-3-oxy-propan)-omega-butoxy-Polyoxyethylenen und alpha-omega-Dibutoxypolyoxyethylen abfiltriert. Das Polymer wird in Wasser gelöst mit Salzsäure bis pH 2 angesäuert und 2 Stunden auf 90°C erhitzt. Anschließend wird das entstandene Ethanol als Ethanol-Wassergemisch unter Vakuum abdestilliert, die Lösung mit Natronlauge neutralisiert und das Polymergemisch erneut in Diethylether gefällt und filtriert. Wässrige Gelchromatographie des resultierenden Polymergemischs mit Polyoxyethylenstandards zeigt eine Verteilung mit einem Hauptpeak bei einer mittleren molaren Masse von 4950 g/mol überlagert von einem kleinen Peak bei 9500 g/mol. Die Endgruppenuntersuchung mittels <sup>1</sup>H-NMR ergibt ein Verhältnis von Butyl- zu Aldehydendgruppen von 1,15 zu 1 was einem molaren Gemischverhältnis von alpha-(propan-1-al-3-oxy)-omega-butoxy-Polyoxyethylen (mittlere molare Masse 4950 g/mol) zu alpha-omega-di-butoxypolyoxyethylen (mittlere molare Masse 9500 g/mol) von 93 zu 7 entspricht. Hydroxyendgruppen sind nicht nachweisbar. Das resultierende Polymergemisch kann über die freie Aldehydgruppe direkt an freie primäre Aminogruppen (Lysinreste) von Proteinen gekoppelt werden, ohne die unerwünschte Vernetzung der Proteine zu verursachen.

## Beispiel 2

Herstellung eines Gemisches aus alpha-keto-omega-benzylxyethylen mit alpha-omega-di-Benzylloxypolyoxyethylenen (molare Masse 19000 g/mol)

[0034] Zu einer Lösung von 0,27 g 1,1-Dimethoxy-cyclohexan-2-ol in 2 ml THF in einem Druckreaktor bei Raumtemperatur werden unter Stickstoff 0,42 g Diphenylmethylkalium in 2 ml THF gegeben bis die Färbung verschwindet. Anschließend werden 45 g Ethylenoxid zugegeben und bei Raumtemperatur für 48 Stunden gerührt. Nach der Abreaktion des Ethylenoxids wird mit 0,2 g NaOH erneut alkalisch gestellt und Benzylchlorid im Überschuss zugegeben (3 g) und bei 40°C für 24 Stunden gerührt. Das Reaktionsgemisch wird in Diethylether gegossen und das unlösliche Polymergemisch aus alpha-(1,1-Dimethoxy-2-oxy-cyclohexan)-omega-benzylxy-Polyoxyethylenen und alpha-omega-Dibenzylxy-Polyoxyethylen abfiltriert. Das Polymer wird in Wasser gelöst mit Salzsäure bis pH 2 angesäuert und 2 Stunden auf 90°C erhitzt. Anschließend wird das entstandene Methanol als Methanol-Wassergemisch unter Vakuum abdestilliert, die Lösung mit Natronlauge neutralisiert und das Polymergemisch erneut in Diethylether gefällt und filtriert. Wässrige Gelchromatographie des resultierenden Polymergemischs mit Polyoxyethylenstandards zeigt eine Verteilung mit einem Hauptpeak bei einer mittleren molaren Masse von 19000 g/mol überlagert von geringen Anteilen höhermolekularer Produkte. Die Endgruppenuntersuchung mittels <sup>1</sup>H-NMR ergibt ein Verhältnis von Benzyl zu Ketoendgruppen von 1,4 zu 1, was unter der Annahme gleicher mittlerer molarer Massen von 19000 g/mol, einem molaren Gemischverhältnis von alpha-(1-Keto-2-oxy-cyclohexan)-omega-benzylxy-Polyoxyethylenen zu alpha-omega-di-benzylloxypolyoxyethylen von 84,4 zu 16,6 entspricht. Hydroxyendgruppen sind nicht nachweisbar.

[0035] Das resultierende Polymergemisch kann über die freie Ketogruppe direkt an freie primäre Aminogruppen (Lysinreste) von Proteinen gekoppelt werden ohne die unerwünschte Vernetzung der Proteine zu verursachen.

## Beispiel 3

Herstellung eines Gemisches aus alpha-hydroxy-omega-methoxy-Polyoxyalkylen mit alpha-omega-di-methoxy-Polyoxyethylenen (molare Masse 10000 g/mol)

[0036] Zu einer Lösung von 0,272 g 2-Tetrahydropyran-2-ol in 5 ml THF in einem Druckreaktor bei Raumtemperatur werden unter Stickstoff 47 mg Natrium in 5 ml THF gegeben. Nach der Reaktion des Natriums zum Alkoholat werden 25 g Ethylenoxid zugegeben und bei Raumtemperatur für 48 Stunden gerührt. Nach der Abreaktion des Ethylenoxids wird Methylchlorid im Überschuss zugegeben (1 g) und bei Raumtemperatur für 4 Stunden gerührt. Das Reaktionsgemisch wird in Diethylether gegossen und das unlösliche Polymergemisch aus alpha-(2-oxy-Tetrahydropyran)-omega-nethoxy-Polyoxyethylenen und alpha-omega-Dimethoxypolyoxyethylen abfiltriert. Die Endgruppenuntersuchung mittels <sup>1</sup>H-NMR ergibt ein Verhältnis von Tetrahydropyran zu Methylendgruppen von 1 zu 1,15 was, unter der

# DE 101 26 158 A 1

- Annahme gleicher mittlerer molarer Massen, einem molaren Gemischverhältnis von alpha-(2-oxy-Tetrahydropyranyl)-omega-methoxy-Polyoxyethylen zu alpha-omega-di-methoxypolyoxyethylen von 93 zu 7 entspricht. Entscheidend ist, dass nach diesem Reaktionsschritt keine Hydroxyendgruppen nachweisbar sind. Das Polymer wird zur Abspaltung der 3,4-Dihydro-2H-pyrangruppe in Wasser gelöst mit Salzsäure bis pH 2 angesäuert und 2 Stunden auf 90°C erhitzt.
- 5 Anschließend wird das entstandene 3,4-Dihydro-2H-pyran unter Vakuum abdestilliert, die Lösung mit Natronlauge neutralisiert und das Polymergemisch erneut in Diethylether gefällt und filtriert. In diesem Reaktionsschritt entstehen ein Gemisch aus alpha-hydroxy-omega-methoxy-Polyoxyethylen und alpha-omega-dimethoxy-Polyoxyethylen. Wässrige Gelchromatographie des resultierenden Polymergemischs mit Polyoxyethylenstandards zeigt eine Verteilung mit einem Hauptpeak bei einer mittleren molaren Masse von 10200 g/mol. Das resultierende Polymergemisch wird anschließend
- 10 durch Umsetzung mit 4-Nitrophenylchlorformiat in ein Gemisch aus alpha-(4-Nitrophenylformiat)-aktivierten-omega-methoxy-Polyoxyethylen und Dimethoxypolyoxyethylen umgesetzt, das zur Kopplung an Proteine eingesetzt werden kann. Da vor der Aktivierung mit Nitrophenylchlorformiat keine alpha-omega-di-hydroxy-Polyoxyethylene vorhanden waren, entstehen keine alpha-omega-diaktivierten-Polyoxyethylene und die Kopplung an Proteine verläuft ohne die unerwünschte Vernetzung der Proteine zu verursachen.

15

## Beispiel 4

Herstellung eines Gemisches aus einem verzweigten alpha-(3-methyl-3-oxy-butan-1-al)-omega-polybutyloxy-Polyoxyethylen mit verzweigten alpha-omega-polybutyloxy-Polyoxyethylenen

20

- [0037] Zu einer Lösung von 0,3 g 4,4-Dimethoxy-2-methyl-2-butanol in 10 ml THF in einem Druckreaktor bei Raumtemperatur werden unter Stickstoff 0,41 g Diphenylmethylkalium in 5 ml THF gegeben bis die Färbung verschwindet.
- [0038] Anschließend werden ein Gemisch aus 55 g Ethylenoxid und 0,16 g Glycidol zugegeben und bei Raumtemperatur für 48 Stunden gerührt. Nach der Abreaktion des Ethylenoxids/Glycidol Gemisch wird 1-Chlorbutan im Überschuss zugegeben (2 g) und bei 40°C für 24 Stunden gerührt. Das Reaktionsgemisch wird in Diethylether gegossen und das unlösliche Polymergemisch aus verzweigten alpha-(4,4-Dimethoxy-2-methyl-2-oxy-butan)-omega-poly-butoxy-Polyoxyethylenen und alpha-omega-poly-butoxy-Polyoxyethylenen abfiltrirt. Das Polymer wird in Wasser gelöst mit Salzsäure bis pH 2 angesäuert und für 2 Stunden auf 90°C erhitzt. Anschließend wird das entstandene Methanol unter Vakuum abdestilliert, die Lösung mit Natronlauge neutralisiert und das Polymergemisch erneut in Diethylether gefällt und filtriert. Die Endgruppenuntersuchung mittels <sup>1</sup>H-NMR ergibt ein Verhältnis von Butyl zu Aldehydendgruppen von 2,3 zu 1 was, unter der Annahme gleicher mittlerer molarer Massen, einem molaren Gemischverhältnis von alpha-(2-methyl-2-oxy-butan-4-al)-omega-poly-butoxy-Polyoxyethylenen zu alpha-omega-poly-butoxy-Polyoxyethylen von 91 zu 9 entspricht. Bedingt durch die Verzweigungen ist eine Molmassenbestimmung über Gelpermeationschromatographie mit Polyethylenglykolstandards nur schlecht möglich. Entscheidend ist jedoch, dass keine Hydroxyendgruppen nachweisbar sind.
- [0039] Das resultierende Polymergemisch kann über die freie Aldehydgruppe direkt an freie primäre Aminogruppen (Lysinreste) von Proteinen gekoppelt werden, ohne die unerwünschte Vernetzung der Proteine zu verursachen.

## Patentansprüche

40

1. Gemische aus mindestens 70 Gew.-%, bevorzugt mindestens 90 Gew.-% alpha-hydroxy-omega-alkoxy-Polyoxyalkylenen und 0,5 bis 30 Gew.-%, bevorzugt 0,5 bis 10 Gew.-% alpha-omega-dialkoxy-Polyoxyalkylenen dadurch gekennzeichnet, dass der Anteil an Dihydroxy-Polyoxyalkylenen als Verunreinigungen kleiner 1 Gew.-% bevorzugt kleiner als 0,2 Gew.-% ist.
2. Gemische aus mindestens 70 Gew.-%, bevorzugt mindestens 90 Gew.-% alpha-aktivierten-omega-alkoxy-Polyoxyalkylenen und 0,5 bis 30 Gew.-%, bevorzugt 0,5 bis 10 Gew.-% alpha-omega-dialkoxy-Polyoxyalkylenen, dadurch gekennzeichnet, dass der Anteil an di-aktivierten Polyoxyalkylene als Verunreinigungen kleiner 1 Gew.-% bevorzugt kleiner als 0,2 Gew.-% ist.
3. Gemische aus mindestens 70 Gew.-%, bevorzugt mindestens 90 Gew.-% alpha-aktivierten-omega-hydroxy-Polyoxyalkylenen und 0,5 bis 30 Gew.-%, bevorzugt 0,5 bis 10 Gew.-% di-hydroxy-Polyoxyalkylenen, dadurch gekennzeichnet, dass der Anteil an di-aktivierten Polyoxyalkylen Verunreinigungen kleiner 1 Gew.-% bevorzugt kleiner als 0,2 Gew.-% ist.
4. Gemische gemäß Anspruch 1–3, erhältlich nach einem Verfahren gemäß Anspruch 13–18, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus Initiatormolekülen der allgemeinen Formel R<sup>4</sup>-(A)-(R<sup>10</sup>)<sub>j</sub>(XH)<sub>e</sub> mit H = acides Wasserstoffatom, R<sup>4</sup> = Schutzgruppe, die unter alkalischen Bedingungen stabil ist, A = aktivierte oder aktivierbare Gruppe, X = O oder NR<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> = H, Aryl oder C<sub>1</sub> bis C<sub>12</sub>-Alkyl, b = 0 bis 7 und e = 1 bis 12, R<sup>10</sup> eine beliebige lineare oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 12 C-Atomen an denen XH-Reste gebunden sind, j = 0 oder 1 die mindestens ein acides Wasserstoffatom an einer Sauerstoff oder Stickstoffgruppe (X) aufweisen und gleichzeitig eine aktivierte oder aktivierbare Gruppe A, die durch eine Schutzgruppe, die unter alkalischen Bedingungen stabil ist, geschützt ist, hergestellt werden.
5. Gemische gemäß den vorangehenden Ansprüchen, dadurch gekennzeichnet, dass der mehrstufige Herstellungsprozess aus folgenden 4 Schritten besteht:
  1. Schritt: Überführung des Initiatormoleküls gemäß Anspruch 4 R<sup>4</sup>-(A)-(R<sup>10</sup>)<sub>j</sub>(XH)<sub>e</sub> in das entsprechende Initiatoranion R<sup>4</sup>-(A)-(R<sup>10</sup>)<sub>j</sub>X<sup>-</sup> (für e = 1) bzw. in das Initiatorpolyanion R<sup>4</sup>-(A)-(R<sup>10</sup>)<sub>j</sub>(X<sup>-</sup>)<sub>e</sub> (für e > 1)
  2. Schritt: Anionische Polymerisation eines Alkylenoxid oder eines Gemisch von Alkylenoxiden mit dem Initiatoranion als Startmolekül zu einem alpha-geschützten-omega-hydroxy-Polyoxyalkylen.

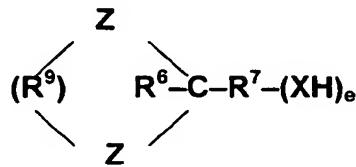
# DE 101 26 158 A 1

3. Schritt: Veretherung der im Schritt 2 entstehenden omega-Hydroxygruppen des alpha-geschützten-omega-hydroxy-Polyoxyalkylen mit einem Alkylierungsreagens.
4. Schritt: Abspaltung der Schutzgruppe ( $R^4$ ) des alpha-geschützten-omega-alkoxy-Polyoxyalkylens bzw. des alpha-geschützten-omega-poly-alkoxy-Polyoxyalkylen zur Freisetzung der aktivierten Gruppe oder aktivierbaren Gruppe (A) des ursprünglichen Initiatormoleküls.
5. Schritt: Gemische gemäß den Ansprüchen 2 bis 5 dadurch gekennzeichnet, dass sie durch einen mehrstufigen Prozess aus Hydroxy- oder Aminoacetalen oder Hydroxy- oder Aminothioacetalen gemäß folgender allgemeiner Formel als Initiatormolekül hergestellt werden.

$R^8Z$

$\backslash$   
 $R^6-C-R^7-(XH)_e$

$/$   
 $R^8Z$



$R^8 = C_1$  bis  $C_{18}$ -Alkyl

$R^6 = H$  oder  $C_1$  bis  $C_{18}$ -Alkyl

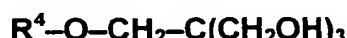
$R^7 =$  eine beliebige lineare oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 12 C-Atomen an denen XH-Reste gebunden sind. X = O oder NR^3 mit R^3 = H, Aryl oder  $C_1$  bis  $C_{12}$ -Alkyl

Z = O oder S, R^9 =  $C_1$  bis  $C_{12}$ -Alkenylrest und e = 1 bis 12.

10. Gemische nach Anspruch 2-6, dadurch gekennzeichnet, dass die aktivierte Gruppe eine Aldehyd- oder Ketogruppe ist.

11. Gemische gemäß den Ansprüchen 1 bis 5 dadurch gekennzeichnet, dass das beschriebene Initiatormolekül eine einfach geschützte Di- oder Polyhydroxyverbindung darstellt, deren Schutzgruppe unter alkalischen Bedingungen stabil ist, jedoch unter sauren oder hydrierenden Reaktionsbedingungen in Schritt 4 leicht gespalten werden kann.

12. Gemische gemäß den Ansprüchen 1 bis 5 und Anspruch 7 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das beschriebene Initiatormolekül eine der folgenden allgemeinen Strukturformeln aufweist.



mit  $R^4$  = Benzyl, tert.-Butyl, Triphenylmethyl, Methyltriphenylmethyl, Diphenylmethyl Trimethoxybenzyl, Di-methoxybenzyl, 2-Tetrahydropyranyl, 2-Tetrahydrofuranyl, Methoxymethyl, Benzyloxymethyl, t-Butoxymethyl, 2-Methoxyethoxymethyl, 1-Ethoxyethyl, 1-Methyl-1-methoxyethyl, 1-Methyl-1-benzyloxymethyl, p-Methoxybenzyl, Trialkylsilyl

und d = 0 bis 6, a = 0 bis 8, f = 0 bis 4, g = 0 bis 4 und  $R^{11} = C_1-C_6$ -Alkyl.

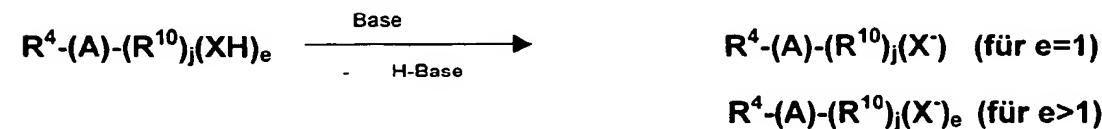
13. Gemische gemäß den vorangegangenen Ansprüchen, dadurch gekennzeichnet, dass das Polyoxyalkylen Polyoxyethylen ist.

14. Gemische gemäß den vorangegangenen Ansprüchen, dadurch gekennzeichnet, dass das Gemisch aus Alkylenoxiden in Schritt 2 des mehrstufigen Prozesses ein Gemisch aus Ethylenoxid und Glycidol mit einem Anteil von 0,1-4 Gew.-% bevorzugt 0,1-1 Gew.-% Glycidol ist.

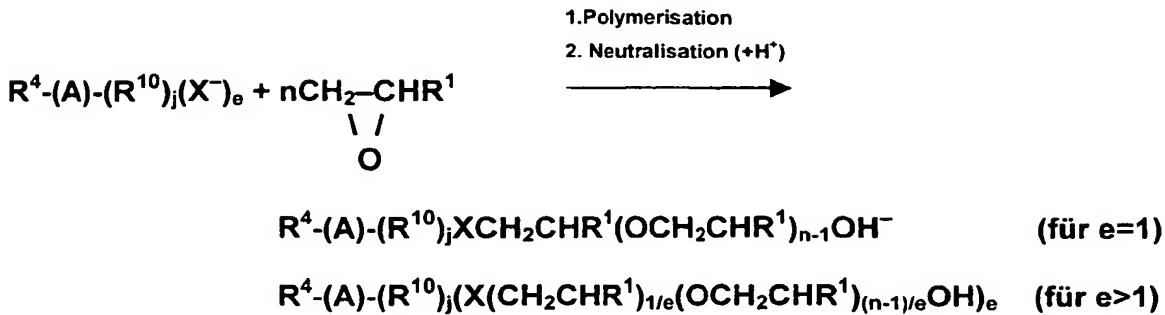
15. Gemische gemäß den vorangegangenen Ansprüchen, dadurch gekennzeichnet, dass die mittlere molare Masse der erfindungsgemäßen Gemische zwischen 1000 und 150 000 g/mol, bevorzugt zwischen 3000 und 75 000 g/mol liegt.

16. Verfahren zur Herstellung der Gemische aus Anspruch 1-13, durch einen mehrstufigen Herstellungsprozess der aus folgenden 4 Schritten besteht:

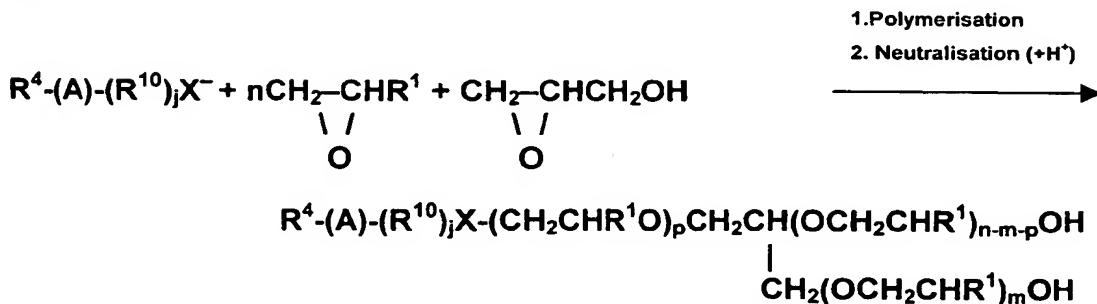
1. Schritt: Überführung des Initiatormoleküls gemäß Anspruch 4 oder 9 in das entsprechende Initiatoranion gemäß folgender Reaktionsgleichung



2. Schritt: Anionische Polymerisation eines Alkylenoxid oder eines Gemisch von Alkylenoxiden mit dem Initiatoranion als Startmolekül zu einem alpha-geschützten-omega-hydroxy-Polyoxyalkylen bzw. zu einem alpha-geschützten-omega-polyhydroxy-Polyoxyalkylen gemäß folgenden Reaktionsgleichungen:

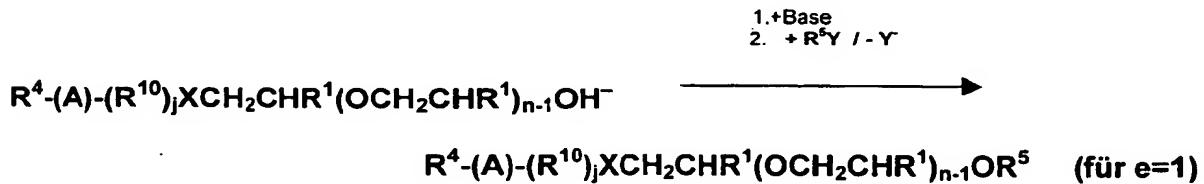


oder

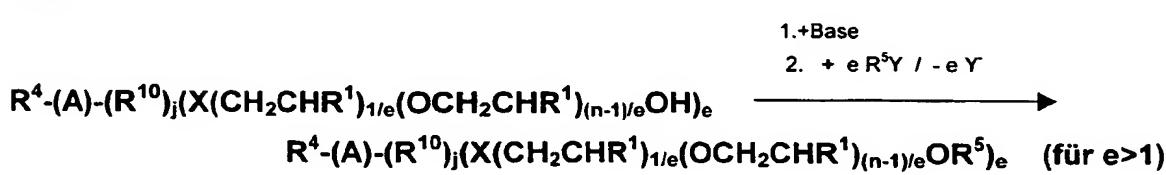


mit  $R^4$  = Schutzgruppe, die unter alkalischen Bedingungen stabil ist, A = aktivierte oder aktivierbare Gruppe, X = O oder  $NR^3$  und  $R^3$  = H, Aryl oder  $C_1$  bis  $C_{12}$ -Alkyl, n = 5 bis 2000,  $R^1$  =  $C_1$  bis  $C_{12}$ -Alkyl oder H und m, p ganze Zahlen zwischen 0 und 2000 wobei gilt  $m + p < n$ , e = 1 bis 12,  $R^{10}$  eine beliebige lineare oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 12 C-Atomen an denen XH-Reste gebunden sind, j = 0 oder 1

3. Schritt: Veretherung der im Schritt 2 entstehenden omega-Hydroxygruppe des alpha-geschützten-omega-hydroxy-Polyoxyalkylen bzw. des entsprechenden Alkoholatanions mit einem Alkylierungsreagens gemäß folgender Reaktionsgleichung



bzw.



mit  $R^5 = C_1$  bis  $C_{12}$ -Alkyl und  $Y = \text{Halogen oder } SO_4-R^5$   
 $n, e, A, R^4, X, R^1, R^{10}$  haben die Bedeutungen wie oben.

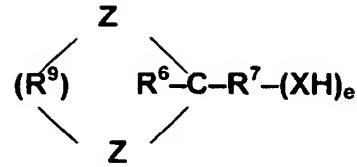
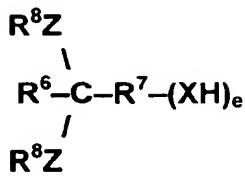
4. Schritt: Abspaltung der Schutzgruppe ( $R^4$ ) des alpha-geschützten-omega-alkoxy-Polyoxyalkylen zur Freisetzung der aktivierten oder aktivierbaren Gruppe (A) des ursprünglichen Initiatormoleküls.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Alkylenoxid Ethylenoxid ist.

15. Verfahren nach Anspruch 13 und 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Gemisch aus Alkylen

misch aus Ethylenoxid und Glycidol mit einem Anteil von 0,1-4 Gew.-% bevorzugt 0,1-1 Gew.-%

16. Verfahren nach Anspruch 13, 14 und 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Initiatormolekül ein Hydroxy- oder Aminoacetal oder ein Hydroxy- oder Aminothioacetal gemäß einer der folgenden allgemeinen Formeln ist.



$\text{R}^8 = \text{C}_1$  bis  $\text{C}_{18}$ -Alkyl

$\text{R}^6 = \text{H}$  oder  $\text{C}_1$  bis  $\text{C}_{18}$ -Alkyl

$\text{R}^7 =$  eine beliebige lineare oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 12 C-Atomen an denen XII-Reste gebunden sind, X = O oder  $\text{NR}^3$  mit  $\text{R}^3 = \text{H}$ , Aryl oder  $\text{C}_1$  bis  $\text{C}_{12}$ -Alkyl

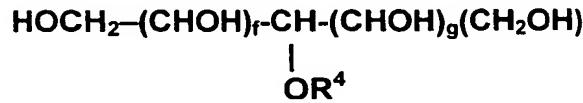
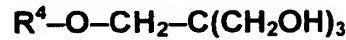
$\text{Z} = \text{O}$  oder S

$\text{R}^9 = \text{C}_1$  bis  $\text{C}_{12}$ -Alkenylrest

und e = 1 bis 12.

17. Verfahren nach Anspruch 13, 14 und 15, dadurch gekennzeichnet, dass das beschriebene Initiatormolekül eine einfach geschützte Di- oder Polyhydroxyverbindungen darstellt, deren Schutzgruppe unter alkalischen Bedingungen stabil ist, unter sauren oder hydrierenden Reaktionsbedingungen in Schritt 4 leicht gespalten werden kann.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Initiatormolekül eine der folgenden allgemeinen Strukturformeln aufweist.



mit  $\text{R}^4 =$  Benzyl, tert-Butyl, Triphenylmethyl, Methyltriphenylmethyl, Diphenylmethyl Trimethoxybenzyl, Di-methoxybenzyl, 2-Tetrahydropyranyl, 2-Tetrahydrofuranyl, Methoxymethyl, Benzyloxymethyl, t-Butoxymethyl, 2-Methoxyethoxymethyl, 1-Ethoxyethyl, 1-Methyl-1-methoxyethyl, 1-Methyl-1-benzyloxymethyl, p-Methoxybenzyl, Trialkylsilyl

und d = 0 bis 6, a = 0 bis 8, f = 0 bis 4, g = 0 bis 4 und  $\text{R}^{11} = \text{C}_1\text{-C}_6$ -Alkyl.

19. Gemische aus einfach aktivierten oder einfach aktivierbaren Polyoxyalkylenen mit nicht aktivierten und nicht aktivierbaren Polyoxyalkylenen gemäß Anspruch 1 bis 12, erhältlich nach dem Verfahren der Ansprüche 13 bis 18.

20. Verwendung der Gemische, die einfach aktivierte Polyoxyalkylenen enthalten gemäß Anspruch 2, 3, 4, 5, 6, 7,

10, 11, 12 und 19 zur chemischen Kopplung und Modifizierung von Proteinen und biologisch aktiven Molekülen.

21. Verwendung der Gemische, die einfach aktivierbare Polyoxyalkylene enthalten gemäß Anspruch 1, 4, 5, 8, 9,

10, 11, 12 und 19 zur Herstellung von Gemischen aus spezifisch einfach aktivierten Polyoxyalkylenen die zur chemischen Kopplung und Modifizierung von Proteinen und anderen biologisch aktiven Molekülen eingesetzt werden können.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**